

Pengaruh Pemberian Vitamin D₃ terhadap Kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada Sel PHM1-41 yang Mengalami Hipoksia

Muhammad Alamsyah Aziz,¹ Sofie Rifayani Krisnadi,¹ Budi Setiabudiawan,² Budi Handono¹

¹Divisi Fetomaternal Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, Indonesia, ²Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung, Indonesia

Abstrak

Kelahiran *preterm* (kurang bulan) merupakan salah satu penyebab kematian bayi yang hingga kini menjadi permasalahan di seluruh dunia. Salah satu mekanisme patofisiologis yang menyebabkan kelahiran kurang bulan adalah aktivitas sumbu hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA) pada ibu dan janin. Stres maternal biologis berupa hipoksia merupakan salah satu penyebab terjadi mekanisme kelahiran kurang bulan melalui jalur aktivasi sumbu HPA ibu dan sebagai respons terhadap *reactive oxygen species* (ROS). Vitamin D₃ sebagai salah satu sumber ion Ca²⁺ dibutuhkan untuk mekanisme kontraksi dan relaksasi otot halus miometrium. Selain itu, vitamin D diduga berpengaruh terhadap kerja sumbu HPA. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan vitamin D₃ pada sel lini PHM1-41 yang menjadi model *in vitro* dari kontraksi miometrium pada ibu hamil yang mengalami stres hipoksia terhadap kadar ROS intraseluler sel PHM1-41. Penelitian dilakukan di Laboratorium penelitian Aretha Medika Utama, *Biomolecular and Biomedical Research Centre* dengan kurun waktu penelitian dari bulan Desember 2017 hingga Februari 2018. Sel PHM1-41 yang telah dikultur dengan keadaan hipoksia selama 24 jam diberi penambahan vitamin D₃, kemudian diukur kadar ROS intraselulernya. Hasil menunjukkan bahwa kadar ROS menurun signifikan pada kelompok sel yang diberi penambahan vitamin D₃ dengan konsentrasi 150 nM dibanding dengan kelompok sel kontrol hipoksia. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan vitamin D₃ 150 nM memiliki potensi mencegah kelahiran kurang bulan.

Kata kunci: Hipoksia, kadar ROS, kontraksi miometrium, sel PHM1-41, vitamin D₃

Effects of Vitamin D₃ Treatment on Reactive Oxygen Species (ROS) Level in PHM1-41 Cell Line Experiencing Hypoxia

Abstract

Preterm birth is one of the major global cause of perinatal mortality. One of the pathophysiologic mechanisms leading to preterm birth is the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis activity of mother and fetus. Maternal biological stress, such as hypoxia condition, is one of the trigger of preterm birth through the activation of HPA axis as a response to the reactive oxygen species (ROS). Vitamin D₃ as a source of Ca²⁺ ion is needed for myometrium smooth muscle's contraction and relaxation mechanism. Vitamin D is also thought to strongly influence the HPA axis's work. The purpose of this study was to determine the effect of vitamin D₃ provision on PHM1-41 cell line induced by hypoxia as an of pregnant women's myometrium contraction through assessment of intracellular ROS level in PHM1-41 cell lines. This study was conducted in Aretha Medika Utama Biomolecular and Biomedical Research Centre from December 2017 to February 2018. PHM1-41 cells were cultured for 24 hours in hypoxia condition, Vitamin D₃ was then added and the level of intracellular ROS was measured. Results showed that the ROS level decreased in cell clusters receiving 150 nM vitamin D₃ when compared to control hypoxia cell cluster. This indicates that the provision of 150 nM vitamin D₃ potentially prevents preterm labor incidents.

Key words: Hypoxia, myometrium contraction, PHM1-41 cell line, ROS Level, Vitamin D₃

Korespondensi: Muhammad Alamsyah Aziz, dr., SpOG(K), KIC, M.Kes, Divisi Fetomaternal, Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin, Jalan Pasteur No. 38 Bandung, Email: alamsyahaziz9119@gmail.com

Pendahuluan

Kelahiran *preterm* atau kurang bulan (kelahiran yang terjadi pada usia kehamilan 20 minggu hingga 36 minggu) merupakan salah satu penyebab kematian bayi yang sampai saat ini masih menjadi permasalahan di seluruh dunia yang dapat menyebabkan komplikasi sehingga mengakibatkan kematian pada anak usia kurang dari 5 tahun dan menjadi penyebab disabilitas seumur hidup pada anak yang mampu bertahan hidup.^{1,2} Menurut data *World Health Organization* (WHO), setiap tahun diperkirakan 15 juta bayi dilahirkan kurang bulan dengan perbandingan kejadian kelahiran kurang bulan dan kelahiran cukup bulan mencapai 1:10.¹

Indonesia merupakan salah satu negara yang berkontribusi tinggi terhadap angka kelahiran kurang bulan di dunia. Pada tahun 2010, Indonesia menempati urutan kelima setelah India, China, Nigeria, dan Pakistan dengan angka kelahiran kurang bulan mencapai 675.700 kasus dan rasio kelahiran kurang bulan mencapai 15,5% per 100 kelahiran hidup.²

Kelahiran kurang bulan merupakan proses yang bersifat multifaktorial. Berdasarkan atas penelitian yang dilakukan oleh Lockwood dan Kuczynski³, patofisiologi kelahiran kurang bulan terjadi melalui empat mekanisme utama. Keempat mekanisme tersebut adalah inflamasi dan infeksi, aktivasi sumbu hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA) pada ibu dan janin, pendarahan desidua, serta peregangan patologis pada uterus.³⁻⁵

Stres maternal merupakan salah satu penyebab mekanisme kelahiran kurang bulan melalui jalur aktivasi sumbu HPA ibu dan janin yang meliputi stres psikologis dan stres biologis. Pada saat stres biologis terjadi, tubuh secara aktif beradaptasi untuk merespon ancaman stres tersebut dengan mengubah dan mengatur berbagai sistem dalam tubuh dengan mengaktifkan sumbu HPA pada ibu dan janin. Stres oksidatif merupakan salah satu agen penyebab terjadinya stres secara biologis pada ibu hamil. Stres oksidatif terjadi pada saat laju produksi radikal bebas lebih tinggi daripada laju eliminasinya.⁶

Radikal bebas atau biasa dikenal dengan *reactive oxygen species* (ROS) selain terdapat di udara bebas juga dihasilkan oleh sel dalam tubuh akibat aktivitas pembuatan energi (ATP). Pada proses pembentukan ATP, yakni pada tahap transpor elektron terdapat kemungkinan kebocoran elektron sebesar 1–3% dan elektron tersebut bereaksi dengan oksigen sehingga

terjadi pembentukan superoksida. Superoksida tersebut kemudian dapat mengalami dismutasi menjadi H₂O₂, salah satu senyawa ROS.⁷ Keadaan oksigen yang berikatan dengan elektron bebas ini dapat menyebabkan keadaan hipoksia pada sel.

Stres oksidatif berupa kondisi hipoksia ini yang menyebabkan aktivasi sumbu HPA dalam kasus kelahiran kurang bulan. Aktivasi sumbu HPA menghasilkan *output* berupa peningkatan kadar CRH serta terjadinya stres oksidatif yang ditandai oleh peningkatan jumlah ROS. CRH telah diketahui memengaruhi kadar hormon yang berperan dalam proses kelahiran tepat bulan maupun kurang bulan seperti progesteron, estrogen, dan juga oksitosin. Saat kadar CRH meningkat, terjadi penurunan kadar progesteron (*progesterone withdrawal*) dan peningkatan kadar hormon estrogen. Peningkatan kadar estrogen lalu meningkatkan produksi hormon oksitosin maupun ekspresi berbagai CAP yang bersifat estrogen-dependen seperti *Connexin-43*, COX-2 dan lainnya.⁴

Connexin-43 merupakan protein asosiasi *gap junction* yang mempunyai peran penting pada proses kontraksi miometrium. Pada saat menjelang kelahiran, ekspresi *Connexin-43* meningkat hingga 2–3 kali lipat bila dibanding dengan masa awal kehamilan. Ukuran junction juga mengalami pelebaran untuk memudahkan transportasi sinyal dari transduksi antarsel miometrium. Selain dipengaruhi oleh estrogen, *Connexin-43* juga diregulasi secara langsung oleh hormon CRH dan ROS. CRH mengaktifkan *Connexin-43* melalui proses aktivasi faktor transkripsi 1 (AP-1). CRH bekerja meningkatkan ekspresi *Connexin-43* melalui interaksinya dengan faktor transkripsi c-Fos yang akan berikatan dengan sekuens promotor (AP-1) gen yang mengkode protein *Connexin-43*. ROS juga diketahui meningkatkan ekspresi *Connexin-43* dengan upregulasi transkripsi melalui interaksi dengan sekuens AP-1 bagian C-Jun. Peningkatan ekspresi *Connexin-43* akan dapat meningkatkan kontraksi miometrium yang memiliki koordinasi dengan baik hingga akhirnya menyebabkan proses kelahiran.⁸

Selain dapat meningkatkan ekspresi CAP *Connexin-43*, ROS juga diketahui berperan dalam mekanisme peningkatan kontraksi otot halus sel miometrium. ROS mengaktifkan protein kinase C (PKC) yang berperan dalam kontraksi aktin dan miosin sel otot miometrium. Selain kontraksi aktin, aktivasi PKC oleh ROS juga memengaruhi *ion channel large-conductance voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel* (BKCa). BKCa merupakan

ion channel penting yang berperan dalam meregulasi potensial membran sel miometrium. Dalam keadaan aktif, BKCa menjaga agar tidak terjadi perubahan membran potensial sehingga miometrium tetap dalam keadaan *quiescence*. Aktivasi PKC membantu menghambat aktivitas ion channel BKCa. Saat aktivitas BKCa menurun, terjadi perubahan membran potensial dari hiperpolar menjadi depolar. Akibatnya terjadi kaskade transduksi sinyal melalui *second messenger* sehingga terjadi aktivasi aktin dan dan perubahan kondisi miometrium dari relaksasi menjadi kontraksi.⁸ Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa aktivasi sumbu HPA akibat tingginya kadar ROS dalam sel yang meningkatkan kadar CRH yang dapat memicu hormon-hormon yang terkait dengan proses kontraksi miometrium. Selain itu, peningkatan CRH dapat menyebabkan pemendekan *cervical length* (CL) dan meningkatkan risiko kelahiran kurang bulan.⁹

Penelitian mengenai patofisiologi kelahiran kurang bulan telah banyak dilakukan, namun penelitian mengenai patofisiologi kelahiran kurang bulan melalui *pathway* lainnya masih cukup jarang, termasuk melalui jalur aktivasi sumbu HPA akibat terjadi stres. Adapun hasil penelitian mengenai pengaruh stres terhadap aktivasi sumbu HPA masih menghasilkan data yang kontradiktif.¹⁰ Hal tersebut menjadi bahan pertimbangan bahwa penelitian ini memang perlu untuk dilakukan.

Oleh karena itu, penelitian untuk mencari solusi pencegahan kelahiran kurang bulan masih harus terus dilakukan dengan eksplorasi terhadap berbagai mekanisme patofisiologis yang ada, salah satunya dengan mengamati pengaruh dari pemberian vitamin D₃ yang merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan dalam kehamilan. Pemberian vitamin D₃ sebagai antioksidan ini diharapkan dapat menurunkan kadar ROS sehingga aktivasi sumbu HPA dapat dihindari dan kontraktilitas miometrium dapat dicegah.

Metode

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL). Hasilnya berupa data kuantitatif yang ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Aretha Medika Utama *Biomolecular And Biomedical Research Center* selama kurang lebih 3 bulan masa penelitian, yaitu dimulai dari bulan Desember 2017 hingga

bulan Februari 2018.

Sel lini PHM1-41 (ATCC ® CRL-3046) yang telah didapatkan di *thawing*, kemudian dikultur dan diinkubasi pada kondisi 5% CO₂, 16–20% O₂, dan suhu 37°C dengan menggunakan medium pertumbuhan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco 11995065) yang telah disuplementasi dengan 0,1 mg/mL *Geneticin* (G-418) (Gibco 10131035), 2 mM *Glutamine* (Gibco 25030081), 10% *fetal bovine serum* (FBS) *Qualified* (Gibco 26140079), 1% *antibiotic and antimycotic* (ABAM) (Gibco 1772653). Sel kemudian disubkultur dan dibagi ke dalam tiga kelompok sel untuk perlakuan. Kelompok sel pertama merupakan kontrol nonhipoksia (P1), kelompok sel kedua merupakan sel yang diberi perlakuan hipoksia tanpa penambahan vitamin D₃ (kelompok kontrol hipoksia atau P2), sedangkan kelompok sel ketiga diberi perlakuan hipoksia dengan penambahan vitamin D₃ yang dilarutkan dalam 1% alkohol dengan variasi konsentrasi, yaitu 300 nM (P3), 150 nM (P4), 50 nM (P5), 10 nM (P6), dan 5 nM (P7). Penelitian yang dilakukan oleh Thota dkk.¹¹ menunjukkan bahwa penambahan vitamin D dengan konsentrasi 5–300 nM (signifikan pada 150–300 nM) dapat menurunkan ekspresi reseptor estrogen dan ekspresi *Connexin-43*. Hal ini yang menjadi dasar pemilihan kadar konsentrasi vitamin D₃ pada penelitian ini yang dianggap aman bagi sel lini PHM1-41 dan diduga dapat menurunkan kadar ROS intraseluler pada sel PHM1-41 karena dapat menurunkan ekspresi *Connexin-43* yang meningkat pada saat kadar ROS dalam sel tinggi yang memicu kontraktilitas sel miometrium. Kelompok kontrol nonhipoksia dikultur selama 24 jam pada kondisi kultur normal, yaitu 5% CO₂, 16–20% O₂, dan suhu 37°C, sedangkan untuk kelompok kontrol hipoksia dan kelompok hipoksia yang ditambah perlakuan vitamin D₃ dikultur selama 24 jam pada kondisi 5% CO₂, 2% O₂, dan suhu 37°C. Setelah dikultur selama 24 jam, ketiga kelompok sel diukur kadar ROS intraselulernya. Pengukuran kadar ROS dilakukan terhadap ketiga kelompok sel yang telah mendapat perlakuan menggunakan *DCFDA Cellular ROS Detection Kit* (Abcam ab113851). Pengukuran kadar ROS dilakukan menggunakan alat *flow cytometer* (Miltenyi MACSquant Analyzer 10).

Hasil pengukuran kadar ROS disajikan dalam bentuk rerata dan simpangan baku. Pengujian statistik yang digunakan untuk sebaran normal Shapiro-Wilk, kemudian dilanjutkan dengan pengujian *one way ANOVA*. Untuk melihat perbedaan yang nyata antarperlakuan dilakukan

Tabel Kadar ROS pada Sel PHM1-41 yang Diberi Perlakuan Hipoksia dan Penambahan Vitamin D₃

Perlakuan	Kadar ROS (%)	Kadar ROS (MFI)
P1	8,74 ± 0,84 ^{ab}	16,33 ± 0,39 ^c
P2	19,49 ± 1,76 ^e	18,54 ± 0,65 ^{ab}
P3	13,73 ± 0,27 ^d	16,91 ± 0,23 ^b
P4	7,16 ± 0,23 ^a	15,30 ± 0,34 ^a
P5	10,67 ± 0,05 ^{bc}	16,43 ± 0,22 ^b
P6	12,26 ± 0,12 ^{cd}	15,93 ± 0,46 ^{ab}
P7	14,37 ± 0,45 ^d	19,35 ± 0,03 ^c

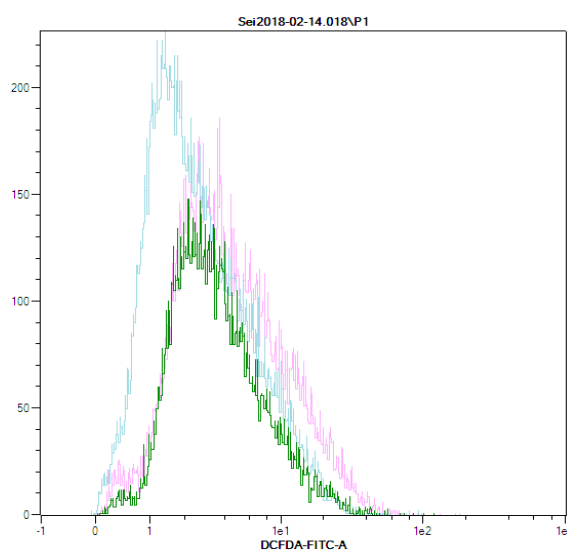
pengujian *Post Hoc Tukey* dengan interval kepercayaan 95% dengan batas kemaknaan ditetapkan $p < 0,05$.

Hasil

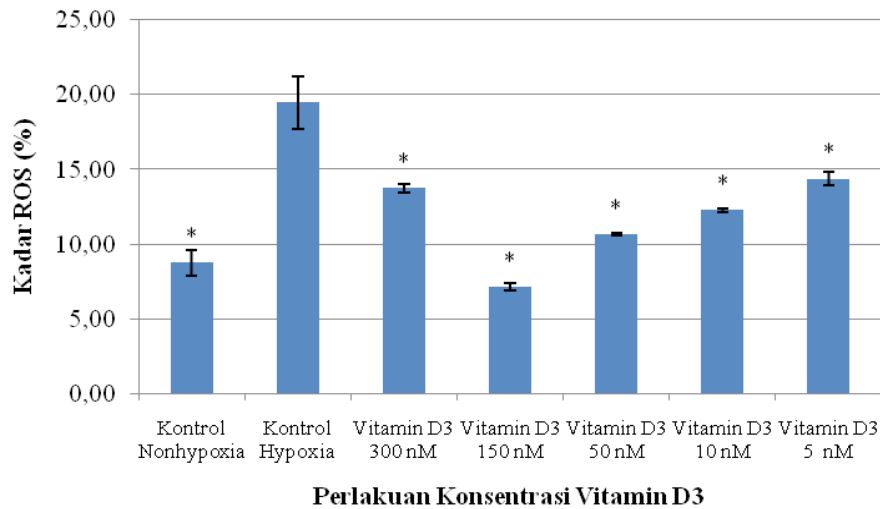
Pengujian kadar ROS intraseluler dilakukan untuk mengetahui kadar ROS yang terdapat pada intraseluler sel lini PHM1-41 yang telah diberi perlakuan hipoksia dan normal (nonhipoksia), dan juga kelompok sel dengan penambahan vitamin D₃ yang mengalami stres oksidatif hipoksia. Kadar ROS memiliki hubungan erat dengan peningkatan hormon dan gen profil regulasi kontraktilitas pada sel PHM1-41. Pada pengujian ini terdapat tiga kelompok perlakuan,

yaitu kelompok kontrol negatif atau kontrol nonhipoksia yang merupakan kelompok sel tanpa perlakuan apa pun yang dikultur dalam keadaan normal (5% CO₂, 16–20% O₂, suhu 37°C). Kelompok kedua merupakan kelompok kontrol positif atau kontrol hipoksia yang merupakan kelompok sel yang diberi perlakuan hipoksia tanpa penambahan vitamin D₃ (dikultur dalam keadaan 5% CO₂, 2% O₂, suhu 37°C), sedangkan kelompok ketiga merupakan kelompok sel yang diberi perlakuan hipoksia dan mendapat penambahan vitamin D₃ dengan berbagai konsentrasi (300, 150, 50, 10, dan 5 nM).

Data disajikan dengan rerata ± standard deviasi. Huruf kecil yang berbeda pada satu baris (presentase) menunjukkan perbedaan signifikan dengan $p < 0,05$ (Tukey HSD *post hoc test*).



Gambar 1 Histogram Perbandingan Pengukuran Kadar ROS pada Kelompok Sel Nonhipoksia, Kelompok Sel Hipoksia, dan Kelompok Sel dengan Penambahan Vitamin D₃ 150 nM



Gambar 2 Grafik Persentase Kadar ROS-DCFDA Intraseluler Sel Lini PHM1-41 yang Mengalami Stres Oksidatif dengan Perlakuan Hipoksia dan Penambahan Vitamin D₃

Tanda (*) menunjukkan perbedaan signifikan bila dibanding dengan kontrol hipoksia. $p < 0.05$ (Tukey HSD post hoc test).

Tabel menunjukkan bahwa nilai persentase kadar ROS intraseluler efektif turun secara signifikan pada konsentrasi vitamin D₃ 150 nM apabila dibanding dengan nilai kadar kontrol hipoksia, nilai penurunan kadar ROS dari $19,49 \pm 1,76\%$ hingga bernilai $7,16 \pm 0,23\%$. Konsentrasi vitamin D₃ 300 nM tersebut dapat menurunkan kadar ROS, tapi tidak lebih efektif dari konsentrasi vitamin D₃ 150 nM. Pada konsentrasi vitamin D₃ 50 nM sampai dengan 5 nM terjadi peningkatan kadar ROS kembali. Kadar ROS pada perlakuan penambahan vitamin D₃ 150 nM terlihat tidak berbeda nyata dengan kontrol nonhipoksia (keadaan kultur sel biasa). Hal ini menunjukkan kadar yang tepat untuk menurunkan kadar ROS intraseluler adalah pada konsentrasi vitamin D₃ 150 nM, yang menunjukkan kondisi ROS tersebut yang hampir mirip dengan keadaan intraseluler sel normal. Efektivitas konsentrasi vitamin D₃ 150 nM menurunkan ROS dapat dilihat pada Gambar 1.

Berbeda dengan nilai kadar ROS yang dilihat dengan *mean fluorescence intensity* (MFI), data pada Tabel tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antara nilai kadar ROS perlakuan hipoksia dan penambahan vitamin D₃ 150 nM. Nilai MFI kadar ROS digunakan untuk melihat rerata pergeseran intensitas fluoresensi yang telah diwarnai dengan pewarna fluoresensi. Pergeseran fluoresensi tersebut dibatasi dengan penentuan rasio positif (*gating*). Pada Gambar

1 kelompok sel dengan penambahan vitamin D₃ 150nM menunjukkan pergeseran fluoresensi kadar ROS ke arah yang lebih negatif, yakni pada 15.30 ± 0.34 MFI. Nilai persentase dan MFI menunjukkan bahwa kadar ROS dapat menurun dengan adanya penambahan vitamin D₃ dengan konsentrasi 150nM.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa kelompok sel kontrol nonhipoksia dan semua kelompok sel yang sudah diberi penambahan vitamin D₃ menunjukkan perbedaan signifikan dibanding dengan kelompok sel kontrol hipoksia. Hal ini dapat dianggap bahwa dengan penambahan vitamin D dengan variasi konsentrasi yang digunakan berpotensi menurunkan kadar ROS pada sel lini PHM1-41 yang mengalami stres oksidatif.

Pembahasan

Keadaan hipoksia atau kurang oksigen merupakan salah satu bentuk stres metabolisme.¹² Stres merupakan penyebab utama aktivasi sumbu HPA dalam kasus kelahiran kurang bulan. Aktivasi sumbu HPA pada umumnya disebabkan oleh kondisi stres pada ibu maupun janin. Stres yang terjadi dapat berupa stres psikologi, fisiologi, fisik, nutrisi, maupun metabolisme. Hipoksia merupakan salah satu bentuk stres metabolisme. Stres memicu aktivasi sumbu HPA yang ditandai

dengan pengeluaran hormon *corticotrophin releasing hormone* (CRH). Hormon CRH kemudian menstimulasi produksi *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) dan menstimulasi peningkatan produksi kortisol. Kortisol kemudian akan berikatan dengan *glukokortikoid* (GR) dan memicu peningkatan metabolisme maupun transkripsi gen yang dimediasi oleh GRE. Peningkatan laju metabolisme akan memicu produksi ROS sehingga melebihi kapasitas eliminasinya dan menyebabkan stres oksidatif.⁷

Pada kondisi normal atau tidak terjadi stres, ROS mampu dinetralisasi oleh tubuh dengan menggunakan antioksidan endogen yang ada di dalam tubuh. Namun, pada saat kondisi stres terjadi, tingginya aktivitas GR akibat kadar kortisol yang bertambah akan menyebabkan peningkatan laju metabolisme sehingga terjadi penumpukan ROS karena antioksidan yang ada tidak cukup cepat mengeliminasi ROS yang diproduksi. Keadaan laju produksi radikal bebas lebih tinggi bila dibanding dengan laju eliminasi ini lebih dikenal dengan istilah stres oksidatif. Keseluruhan proses pembentukan ROS akibat aktivasi sumbu HPA sebagai respons terhadap stres.¹³

Vitamin D yang terdiri atas vitamin D₂ (*ergocalciferol*) dan juga D₃ (*cholecalciferol*), merupakan vitamin yang terlarut dalam lipid dan memiliki banyak efek biologis termasuk dalam kontrol metabolisme kalsium dan fosfor. Dalam kasus kelahiran kurang bulan akibat infeksi dan inflamasi, suplementasi vitamin D diketahui dapat menurunkan respon tubuh terhadap patogen dengan membatalkan produksi senyawa interleukin-6, interleukin-1, dan tumor necrosis faktor α oleh makrofag. Vitamin D juga berperan secara langsung dalam meregulasi kontraktilitas miometrium. Pada sel miometrium terdapat banyak *ion channel* kalsium. Proses metabolisme kalsium tersebut sangat bergantung pada keberadaan vitamin D.¹⁴ Vitamin D₃ diproduksi dari *7-dehydrocholesterol* yang bergantung pada intensitas sinar ultraviolet yang terdapat pada kulit tubuh. Vitamin D dapat memberikan banyak manfaat fisiologis salah satunya mencegah kanker, namun harus dikonversi ke dalam konformasi aktifnya. Vitamin D₃ yang dibentuk dari *7-dehydrocholesterol* kemudian diangkut melalui pembuluh darah dengan bantuan DBP (protein spesifik pengikat vitamin D) ke dalam hati. Vitamin D kemudian dihidrolisis menjadi *25-hydroxyvitamin D₃* (25(OH)D₃). Kemudian (25(OH)D₃) ditranpor ke ginjal dengan bantuan DBP. Di dalam ginjal, (25(OH)D₃) diinternalisasi oleh magalin (lipoprotein superfamili). Pada

proksimal renal tubul, (25(OH)D₃) dihidroksilasi pada posisi satu cincin A yang menghasilkan konformasi aktif (*hormonally active*) vitamin D, yakni *1,25-dihydroxyvitamin D₃* (1,25(OH)₂D₃) yang berfungsi dalam hampir semua proses metabolisme vitamin D.¹⁵

Nilai presentase kadar ROS intraseluler efektif turun secara signifikan pada konsentrasi vitamin D₃ 150 nM dengan nilai 7,16±0,23%. Hal ini dibuktikan dengan pergeseran kelompok sel dengan penambahan vitamin D₃ 150nM menunjukkan pergeseran fluoresensi kadar ROS ke arah yang lebih negatif (ke arah kiri) (Gambar 1). Vitamin D₃ bekerja sebagai antioksidan dengan mencegah proses peroksidasi lipid di peroksisom. Proses peroksidasi lipid merupakan salah satu proses yang menghasilkan ROS sebagai hasil sampingnya. ROS dalam kasus kelahiran kurang bulan dapat memodulasi kontraksi miometrium melalui aktivasi PKC, menghambat aktivitas BKCa, dan meningkatkan ekspresi *Connexin-43*. Vitamin D₃ juga telah diketahui mampu menurunkan jumlah ROS dan mencegah terjadinya stres oksidatif.¹⁶

Vitamin D₃ mempunyai peranan penting dalam kehamilan, secara umum vitamin D dimetabolisme oleh tubuh dengan cara berikatan dengan *vitamin D binding protein* (DBP), yang sebagian komposisinya terdiri atas albumin dan lipoprotein.¹⁷ 1,25(OH)₂D₃ berfungsi sebagai agen anti inflamasi dikarenakan keadaan defisiensi vitamin D menyebabkan peningkatan produk inflamasi seperti sitokin, prostaglandin, dan peningkatan reseptor oksitosin sehingga menyebabkan kehamilan preterm yang ditandai pendataran serviks, peningkatan kontraksi miometrium, dan ketuban pecah dini.¹⁸

Pada penelitian sebelumnya dilakukan oleh Thota dkk.¹¹ determinasi efek penambahan vitamin D terhadap profil regulasi kontraktilitas melalui jalur NFkB. Penelitian tersebut telah membuktikan bahwa penambahan vitamin D dengan konsentrasi 5-300 nM (signifikan pada 150-300 nM) dapat menurunkan ekspresi reseptor estrogen dan ekspresi *Connexin-43*. Berdasar atas hasil dan pembahasan penelitian yang telah dikerjakan mengenai pengaruh pemberian vitamin D₃ terhadap kadar ROS terhadap sel lini otot halus uterin miometrium uterin manusia PHM1-41 yang mengalami stres oksidatif hipoksia dapat disimpulkan bahwa penambahan vitamin D₃ dapat menurunkan kadar ROS. Kadar penambahan vitamin D₃ yang paling optimal untuk menurunkan kadar ROS dalam sel lini otot halus uterin miometrium uterin manusia PHM1-41 yang mengalami stres

oksidatif hipoksia adalah penambahan 150nM vitamin D₃. Penelitian mengenai kadar ROS intraseluler pada sel lini otot halus miometrium manusia PHM1-41 melalui jalur stres biologis berupa hipoksia masih belum dilakukan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini ditemukan bahwa vitamin D₃ pada konsentrasi 5–150 nM dapat menurunkan kadar ROS intraseluler pada sel PHM1-41 yang mengalami kondisi stres hipoksia. Penggunaan vitamin D₃ sebagai antioksidan dapat menjadi salah satu kandidat potensial dalam pencegahan kelahiran kurang bulan. Hal ini juga diharapkan dapat menurunkan hormon dan gen yang terlibat dalam regulasi kontraktilitas pada kelahiran kurang bulan.

Daftar Pustaka

1. WHO. Born too soon: The global action report on preterm birth. Report November 2012. Geneva: WHO News Preterm Birth Report; 2012.
2. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard M, Chou D, Moller AB, Narwal R, dkk. National, regional and worldwide estimates of birth. *Lancet*. 2012;379(9832):2162–72.
3. Lockwood C, Kuczynski E. Makers of risk for delivery. *J PerinMed*. 1999;27:5-20.
4. Goldenberg RL, Culhane JF, Iamss JD, Romero R. Epidemiology and cause of birth. *Lancet*. 2008;371:75–84.
5. Villar J, Papageorgiou AT, Knight HE, Gravett MG, Iams J, Waller SA. The preterm birth syndrome: a prototype phenotypic classification. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 206(2):119–23.
6. Burthor GJ, Jauniaux E. Oxidative stress, best practice and research. *Clin Obstet Gynaecol*. 2010;25:287–99.
7. Jereme GS, Chen HJC, Semia C, Lavidis NA. Activation of hipotalamus-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers Neurosci*. 2015;8(456):1–6.
8. Gomes DS, Machado NR, Fernandes JRM. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *Int J Mol Sci*. 2012;13(9): 10697–721.
9. Moroz LA, Simhan HN. Rate of sonographic cervical shortening and biologic pathwya of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(6):555.e1-5.
10. Kramer MS, Lydon J, Seguin L, Goulet L, Khan SR, McNamara H, dkk. Stress pathway to spontaneous preterm birth: The role of stressors, psycholocial distress, and stress hormones. *Am J Epidemiol*. 2009;169(11):1319–26.
11. Thota C, Laknaur A, Farmer T, Lason G, Alhendy A, Ismail N. Vitamin D regulates contractile profile in human uterine myometrial cells via NFkB pathway. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(4):347.e1-347.e10.
12. Dutta EH, Faranak B, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovsky M, Menon R. Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathway differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membran. *Mol Hum Reprod*. 2016;22(2):143–57.
13. Burthor GJ, Jauniaux E. Oxidative stress, best practice and research. *Clin Obstet Gynaecol*. 2010;25:287–99.
14. Bodnar LM, Simhan HN. Vitamin D maybe link to black white disparties in adverses birth outcomes. *Obstet Gynecol Surv*. 2010;65(4):273–84.
15. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Metab Clin North Am*. 2010;39(2):243–53.
16. Wong SM, Delansorne R, Man RY, Syenningsen P, Vanhoutte PM. Chronic treatment with vitamin D lowers arterial blood pressure and reduce endothelium dependent contraction in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Physiol*. 2010;299(4):1226–34.
17. De-Regil LM, Palacios C, Ansary A, Kulier R, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(2):CD008873
18. Ginde AA, Sullivan AF, Mansbach JM, Camargo CA. Vitamin D insufficiency in pregnant and nonpregnant women of childbearing age in the United States. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(5):436.e1–8.